Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Pregnandiolausscheidung beim pseudograviden Kaninchen unter der Einwirkung von Prolactin (LTH)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Brosi
aus Stuttgart

1971

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Pregnandiolausscheidung beim pseudograviden Kaninchen unter der Einwirkung von Prolactin (LTH)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Brosi
aus Stuttgart

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Mayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Blobel
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

1.) Physiologie der Funktion des Corpus luteum des Kaninchens

2.) Der Progesteronstoffwechsel des Kaninchens

3.) Prolactin. Seine Wirkungsweise, Nachweise und Standardisierung

4.) Fragestellung

II Material und Methode

1.) Tiermaterial

2.) Methode der chemischen Analyse

a. Geräte und Apparaturen

b. Reagentien

c. Arbeitsgang

III Ergebnisse

1.) Versuchsgruppe 1: Leerwert an pseudograviden Kaninchen

2.) Versuchsgruppe 2: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3. Tag

3.) Versuchsgruppe 3: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

4.) Versuchsgruppe 4: a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E.Prolactin "Schering" am 4. Tag

b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E.Prolactin "Schering" am 5. Tag

5.) Versuchsgruppe 5: a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 1o I.E.Prolactin "Schering" am 3. Tag

b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 5 I.E.Prolactin "Schering" am 3. Tag

6.) Zunahme der Pregnandiolausscheidung am 4. Tag nach Prolactingabe am 3. Tag gegenüber dem Wert vor der Prolactingabe

IV Diskussion, Zusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung

V Literatur

VI Lebenslauf

E i n l e i t u n g

Physiologie des Corpus luteum des Kaninchens

Das Kaninchenovar gehört zu den Eierstöcken, die aus vielen reifen Follikeln bestehen. Immer sind sprungreife Follikel vorhanden: Es besteht also Dauerbrunst.
Der Follikelsprung erfolgt nicht wie beim Menschen zyklisch, sondern provoziert.
Physiologische die Ovulation provozierende Reize sind der fertile oder infertile Deckakt, sexuelle Erregung durch reines Bespringen bei verhindertem Koitus, Bespringen durch ein zweites Weibchen oder erotisierendes Bestreichen des Rückens.
Der Follikelsprung erfolgt ca. 1o Stunden post coitum (Heape); 32 Stunden nach dem Deckakt beginnt die Corpus-luteum-Bildung (Sobotta). Bleibt der Follikelsprung aus, so wird aus dem überreifen Follikel ein Blutfollikel (Hammond), der schließlich degeneriert.
Auch wenn keine Befruchtung erfolgt, entsteht aus dem rupturierten Follikel ein Corpus luteum.
Die Funktionsdauer dieser Corpora lutea wird verschieden angegeben: 14 Tage (Ancel und Bouin), 16 - 19 Tage (Hammond), 16 Tage (Knaus).

Der Progesteronstoffwechsel des Kaninchens

Der Aufbau und Metabolismus des Progesterons erfolgt beim Kaninchen gleichartig wie beim Menschen:
Progesteron entsteht über Pregnenolon aus Cholesterin.
Progesteron wird, vor allem als Pregnandiol (Pregnan-3-α-2o-α-diol), zum größten Teil in Form des Glucoronids ausgeschieden. Zum Teil werden auch andere Produkte, wie z.B. Pregnantriol gebildet.
Ein wesentlicher Schritt ist die Hydrierung der Doppelbindung zwischen dem C4 und dem C5 Atom. Dieser Schritt scheint für den Abbau der Hormone begrenzend zu sein und erfolgt durch Enzyme mit $NADPH_2$ als Wasserstoffdonator.

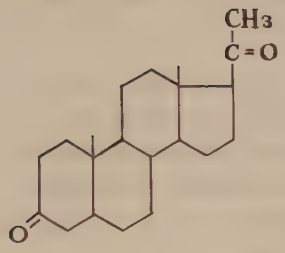
Diese hydrierenden Enzyme befinden sich in der Mikrosomenfraktion (5-α-Dehydrogenase) und im Hyaloplasma (5-β-Dehydrogenase) der Leberzelle.

Prolactin und seine Wirkungsweise

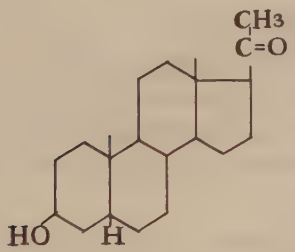
Prolactin ist identisch mit dem LTH (luteotropes Hormon). Es wird in den acidophilen Zellen des HVL gebildet (Dawson 1938). Als Proteohormon stellt es ein Polypeptid aus 17 verschiedenen Aminosäuren (Li 1949) mit einem Molekulargewicht von 33 ooo dar. Prolactin läßt sich in kristallinem Zustand herstellen (White, Li, Simpson, Evans). Die quantitative Verteilung der Aminosäuren zeigt je nach Tierspezies eine geringe Variation.
Prolactin wirkt

1. psychotrop: Bei Fischen (Noble, Kumpf, Billings 1938), bei Hühnern (Riddle und Bates 1939) und bei Ratten löst Prolactin Brutinstinkte aus.
2. mammotrop: Beim pseudograviden Kaninchen (nach sterilem Coitus) konnte nach LTH-Gabe eine Lactation der proliferierten Milchdrüsen gefunden werden (Stricker und Grueter 1928, Folley und Young 1941 und Voss 1941). Folley und Young glauben, daß diese Wirkung nur durch eine polyhormonelle Beeinflussung von HVL-Hormonen erreicht werden kann. Maximal ist diese Wirkung bei einer Kombination von LTH und STH (Lyons, Li, Johnson 1952).
3. luteotrop: LTH stimuliert die Zellen eines vorhandenen Corpus luteum zur Bildung von Progesteron und unterhält deren sekretorische Funktion.

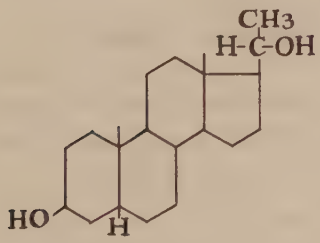
Schema des Progesteronabbaus



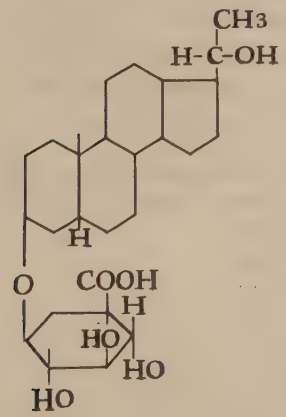
Progesteron



Pregnan-3-α-o1-2o-on



Pregnan-3-α-2o-α-diol
(Pregnandiol)



Pregnandiolglucuronid

Prolactinnachweismethoden:

A Prolactinnachweis durch die proliferative Wirkung auf das Epithel des Taubenkropfes:

1. Originalmethode von Riddle und Braucher (1931):
   Hier wird die Gewichtszunahme des Taubenkropfes nach Stimulierung mit LTH gemessen. Die minimal wirksame Dosis (MWD) beträgt ca. 1 Internationale Einheit (I.E.).

2. Methode nach Mc Shan und Turner (1936):
   Die Proliferation des Taubenkropfes wird durch Helligkeitsabnahme von durchstrahlendem Licht kenntlich gemacht. Als MWD lassen sich ca. 1,25 I.E. ermitteln.

3. Methode nach Lyons und Page (1935) und Bergmann, Meites und Turner (1940):
   Sie steigern die Empfindlichkeit des Tests auf eine MWD von ca. 0,00625 I.E., indem sie die zu untersuchende prolactinhaltige Substanz direkt in die über dem Kropf liegende Haut injizieren.

4. Methode nach Leblond und Ailen (1937):
   LTH löst im Epithel der Kropfdrüsen Zellteilungen als erstes Zeichen der Proliferation aus. Der Mitoseindex gilt als Zeichen der LTH-Aktivität.

5. Methode nach Rabalt und Voss (1939):
   Untersuchung des Kropfabstriches auf sudanophile Tröpfchen. MWD ist ca. 5 I.E.

6. Methode nach v.Berswordt-Wallrabe, Herlyn und Jantzen (1965):
Sie ermöglichen die Bestimmung der Prolactinaktivität im Serum, indem sie bei einer lokalen Mikronmethode zusätzlich ein Cortisonderivat spritzen.

B Prolactinnachweis durch seine lactogene Wirkung:

1. Methode nach Lyons (1942):
Nach intraduktaler Injektion kann man im positiven Fall am 5. Tag Milch auspressen. Es werden kastrierte und hysterektomierte Kaninchen verwendet. Die MWD beträgt ca. 1,5 I.E.

2. Methode nach Bradley und Clarke (1956):
Wie Methode nach Lyons; statt kastrierten hysterektomierten Tieren benützt man hier pseudogravide mit Östrogen-Progesteron vorbehandelte Kaninchen.

3. Methode nach Scowen und Hadfield (1955):
Nach Prolactingabe findet sich bei männlichen Ratten eine Proliferation des Brustdrüsenepithels.

C Der Prolactinnachweis durch Anwendung des luteotropen Effekts:

a. indirekte Methoden: Hierbei wird nicht die unmittelbare Wirkung von Prolactin nachgewiesen, sondern der Progesteroneffekt.

1. Methode nach Kovacic (1962):
Verlängerung des Diöstrus der Maus. Im Vaginalabstrich finden sich Schleim, Reste von Leucocyten und kernhaltige Epithelien. Der Übergang in den Proöstrus - ausschließlich mit kernhaltigen Epithelzellen, normalerweise nach 1 - 2 Tagen - wird verzögert. Die MDW beträgt ca. o,7 - 2,o I.E.

2. Deciduoma-Methode nach Kovacic (1963):
3 Monate alte Mäuse werden hypophysektomiert. Am 3. Tag wird ein Uterushorn traumatisiert. Bis zum 5. Tag wird einmal pro die eine Dosis Prolactin gespritzt. Die Gewichtszunahme des traumatisierten Horns gegenüber dem Kontrollhorn wird bestimmt. Die MWD beträgt ca. 1,5 - 3 I.E.

b. direkte Methode durch den Prolactineffekt auf das Corpus-luteum-Gewebe:

1. Methode nach Browning, Larke und White:
Transplantation von Gelbkörpergewebe in die Augenkammer. Die Bildung und Hyperämie von Corpora lutea dient als Indikator für den Prolactineffekt.

2. Methode nach Wolthuis (1963):
Die Größe und die Anzahl der Gelbkörperzellen pro Blickfeld dienen als Maß für Prolactinaktivität: An infantilen weiblichen Ratten wird durch HCG (Human Chorion Gonadotropin) und PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) die Bildung von Gelbkörperzellen induziert. Die Größenzunahme der Gelbkörperzellen wird indirekt bestimmt. Die MWD beträgt ca. o,1 I.E.

Die noch vor Jahren als spezifischer biologischer Nachweis für Prolactin angesehene Taubenkropfmethode ist in ihrer Spezifität in Frage gestellt, seit Ferguson und Wallace (1961) und v.Berswordt-Wallrabe, Herlyn und Jantzen (1965) im Taubenkropftest Prolactinaktivität von menschlichen Wachstumshormon nachweisen konnten.
Auch der laktogene Effekt ist als spezifischer Prolactinnachweis nicht geeignet. Chadwick, Folley und Gemzell (1961) konnten laktogene Effekte an pseudograviden Kaninchen nach lokaler Anwendung von menschlichem Wachstumshormon nachweisen.

Die Verlängerung des Diöstrus nach Kovacic (1962) ist ebenfalls nicht spezifisch. Das Ergebnis wird durch luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) beeinflußt.

Standardisierung des Prolactin

Die Maßeinheit für Prolactin ist die Internationale Einheit (I.E.) Sie entspricht 1oo Gamma = o,1 mg des internationalen Standardpräparates (Meites, Bergman und Turner).

Fragestellung

Es soll geprüft werden

1. Ist das Corpus luteum des Kaninchens durch Prolactin vom Schwein stimulierbar?
2. Kann dieser Effekt zu einer Nachweismethode für Prolactin ausgebaut werden?
3. Welche experimentellen Bedingungen sind für diese Methode sinnvoll?

Als Versuchstiere werden pseudogravide Kaninchen verwendet. Da beim Kaninchen Ovulation und Corpus-luteum-Bildung nicht zyclisch erfolgen, sondern durch den Kohabitationsreiz auf neutralem Wege provoziert werden, kann durch einen sterilen Deckakt mit einem kastrierten Rammler jederzeit die Bildung eines Corpus luteums erreicht werden.
Diese Methode wurde der sonst üblichen Provozierung eines Follikelsprungs mit Choriongonadotropin vorgezogen, da HCG durch seine zu lange Halbwertszeit von sich aus während des Versuchsablaufes das gebildete Corpus luteum zur Progesteronbildung stimuliert und so zu einer erhöhten Pregnandiolausscheidung führt.

Im einzelnen werden folgende Versuchsgruppen gebildet:

1. Leerwert an pseudograviden Kaninchen

2. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3. Tag

3. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

4a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 4. Tag

4b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 5. Tag

5a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 1o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

5b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 5 I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

Material und Methode

Material:

Als Versuchstiere wurden erwachsene, geschlechtsreife weibliche Kaninchen einer Mischrasse mit einem Durchschnittsgewicht von 3750 g verwendet, die von einem sterilen Rammler besprungen wurden. Die Sterilität wurde durch operative beidseitige Durchtrennung des ductus deferens erreicht. Die Ernährung der Tiere bestand wegen der Urinproduktion nur aus weißen Futterrüben und Wasser; sie wurde über die Dauer des Versuches nicht geändert. Während des Versuches saßen die pseudograviden weiblichen Kaninchen in Stoffwechselkäfigen, in denen täglich ein 24-h-Urin gesammelt und zur Analyse entnommen wurde.

Zur chemischen Analyse wurden benutzt:

Auftragegerät der Grundausrüstung für die Dünnschicht-Chromatographie nach Stahl (Firma Desaga in Heidelberg)
1 Agla-Mikrometerspritze
20 ml, 1 ml, 0,1 ml Pipetten
25 ml Erlenmeyer-Kolben
100 ml Scheidetrichter
Abdampfschalen
MN-Polygram SIL-S-HR für die Dünnschichtchromatographie der Firma Machery-Nagel und Co. in Düren
Molybdatophosphorsäure-Spray der Firma Merck für Chromatographie
Trockenschrank
Wasserbad

Reagentien:

Salzsäure rauchend 37,0 % p.A.	Merck Nr. 317
Cyclohexan p.A.	Merck Nr. 9666
Natronlauge p.A., 0,1 N	Merck Nr. 9141
Chloroform p.A.	Merck Nr. 2445

Vergleichslösung zum Schwangerschafts- und Cyclustest nach Waldi, Gehalt o,1 %
5-Beta-Pregnandiol (3-α-2o-α) Merck Nr. 9282
Aceton
Chloroform
Aqua destillata
Prolactin Schering (1 mg ≙ 2o I.E.) *
Prolactin Ferring, 2oo I.E. pro ccm bestehend aus Trockenampulle 2oo I.E. und Lösungsmittelampulle mit Phenol 1 mg und Aqua destillata ad 1 ml.

* Der Firma Schering AG, Berlin, danke ich an dieser Stelle für die kostenlose Überlassung des Forschungsmaterials.

Methode:

Zur Pregnandiolbestimmung wurde die quantitative Schnellbestimmung von Pregnandiol durch Dünnschichtchromatogramm nach Waldi 1962 benützt.

1. 2o ml Urin werden 2 mal durch ein Papierfilter filtriert.
2. Der filtrierte Urin wird zur Hydrolyse mit 2 ml rauchender HCl versetzt und im Wasserbad erhitzt. Sobald die Temperatur 9o Grad erreicht hat, wird genau 1o Min weiter erhitzt und das Reaktionsgemisch dann sofort mit fließendem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt.
3. Extraktion zur Eliminierung der Östrogene:
   Das abgekühlte Hydrolysat wird in einen Scheidetrichter überführt und 3 mal mit je 25 ml Cyclohexan ausgeschüttet. Die 3 Cyclohexanfraktionen werden 2 mal mit je 2o ml o,1 N NaOH und 2 mal mit je 3o ml Aqua dest. ausgeschüttet.
4. Der gereinigte Extrakt wird bei 9o - 1oo Grad C getrocknet.

5. Der getrocknete Rückstand wird mit Chloroform aufgelöst und in eine Abdampfschale überspült. In dieser Schale wird das Chloroform unter leichtem Erwärmen verdampft.

6. Der Rückstand wird mit o,2 ml Chloroform aufgelöst und in eine Mikrometerspritze gefüllt.
   1oo Teilstriche der Mikrometerspritze entsprechen o,o2 ml des in Chloroform gelösten Extraktes. Sie werden auf MN-Polygram-Platten zusammen mit der o,1 % Pregnandiol-standardlösung aufgetragen.

7. Die Entwicklung der Platten erfolgt in der Entwicklungskammer mit dem Fließmittel Chloroform : Aceton im Verhältnis 9 : 1. Entwicklungszeit für eine zur Beurteilung notwendigen Laufstrecke von ca. 1o cm Länge beträgt ca. 3o Min.

8. Die Platte wird nach Lufttrocknung mit Molybdatophosphorsäure-Spray besprüht und 3o Min im Trockenschrank bei 1oo Grad erhitzt.

9. Auswertung: Die Urinpregnandiolpunkte und die Standardpregnandiolpunkte haben dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit im Chromatogramm (=Rf-Wert). Sie liegen daher in gleicher Höhe und können durch Intensitätsvergleich mit den aufgetragenen Standardlösungen quantitativ bestimmt und auf den 24-h-Urin umgerechnet werden.

Versuche und Ergebnisse

Versuchsgruppe 1

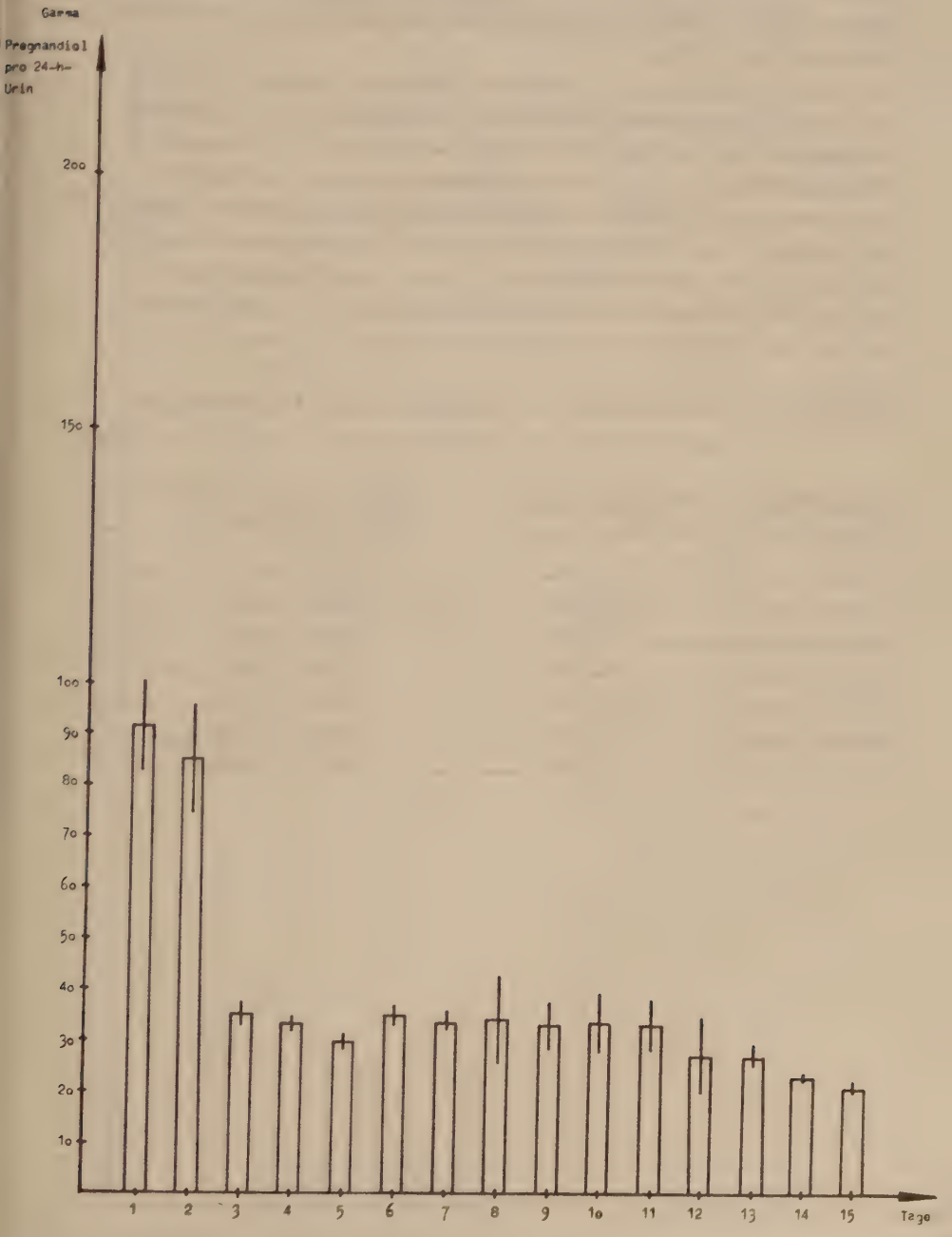
Untersuchung über die Pregnandiolausscheidung von pseudograviden Kaninchen:

Bei 5 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen erfolgt nach Waldi die Pregnandiolbestimmung im täglich untersuchten 24-h-Urin bis einschließlich zum 16. Tag nach dem Decken. Diese Untersuchung dient als Leerwert ohne Prolactininjektion im Vergleich zu den folgenden Untersuchungen. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte der Pregnandiolausscheidungsmengen pro 24-h-Urin, in Gamma dargestellt, finden sich in Tabelle 1, die graphische Darstellung in Abbildung 1. Daraus ist zu erkennen, daß die Pregnandiolmenge pro 24-h-Urin von einem Maximum von 91,87±17,48 Gamma am ersten Tag post coitum schon am 3. Tag auf einen annähernd konstanten Spiegel von 2o-35 Gamma absinkt.

Tabelle 1: Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin von pseudograviden mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
5	1. Tag	91,87±17,46
5	2. Tag	85,o3±21,47
5	3. Tag	35,26± 4,23
5	4. Tag	33,28± 4,81
5	5. Tag	29,43± 2,87
5	6. Tag	35,81± 3,96
5	7. Tag	33,65± 4,18
5	8. Tag	34,92±17,38
5	9. Tag	33,16± 9,12
4	1o. Tag	33,27±11,83
4	11. Tag	33,6o± 9,45
5	12. Tag	27,86±15,19
5	13. Tag	27,54± 4,37
2	14. Tag	23,35± 6,35
2	15. Tag	2o,88± 2,16
1	16. Tag	19,38

Abbildung 1: Leerwert an pseudograviden Kaninchen



Versuchsgruppe 2

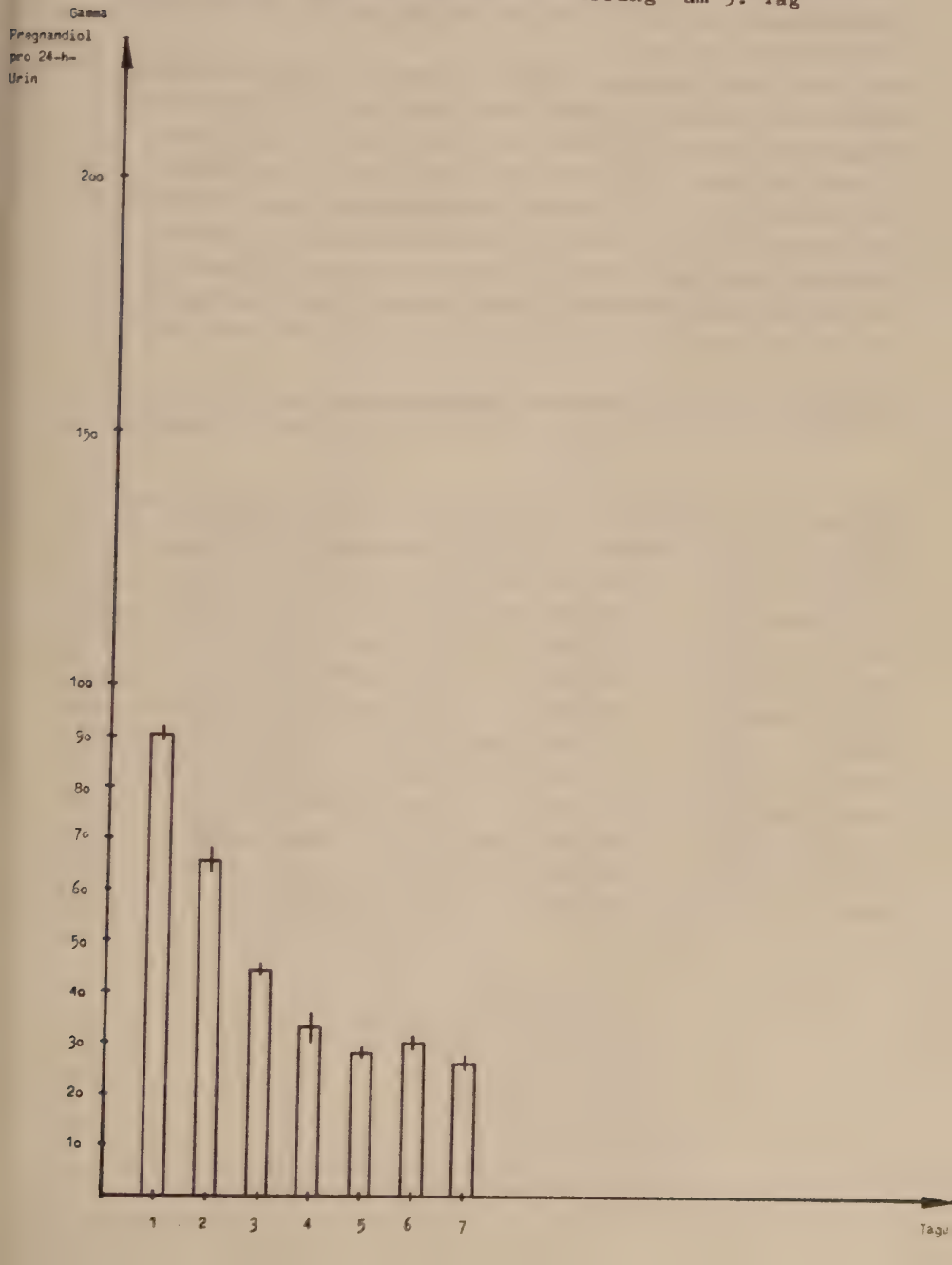
Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3. Tag:

Bei 4 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen wird der täglich entnommene 24-h-Urin nach Waldi auf Pregnandiol untersucht. Am 3. Tag post coitum werden 2o I.E. Prolactin "Ferring" tief i.m. in den M.glutaeus maximus injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 2 und Abbildung 2. Die Werte entsprechen ziemlich genau denen der Versuchsgruppe 1. Von einem Maximalwert von 9o,35±2,15 Gamma Pregnandiol am ersten Tag post coitum erfolgt ein Abfall auf 33,13±5,18 Gamma am 4. Tag.

Tabelle 2: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3.Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
4	1. Tag	9o,35± 2,15
4	2. Tag	65,65± 4,58
4	3. Tag	44,23± 1,92
3	4. Tag	33,13± 5,18
4	5. Tag	28,2o± 2,2o
4	6. Tag	3o,o8± 1,11
4	7. Tag	26,48± 2,28

Abbildung 2: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3. Tag



Versuchsgruppe 3

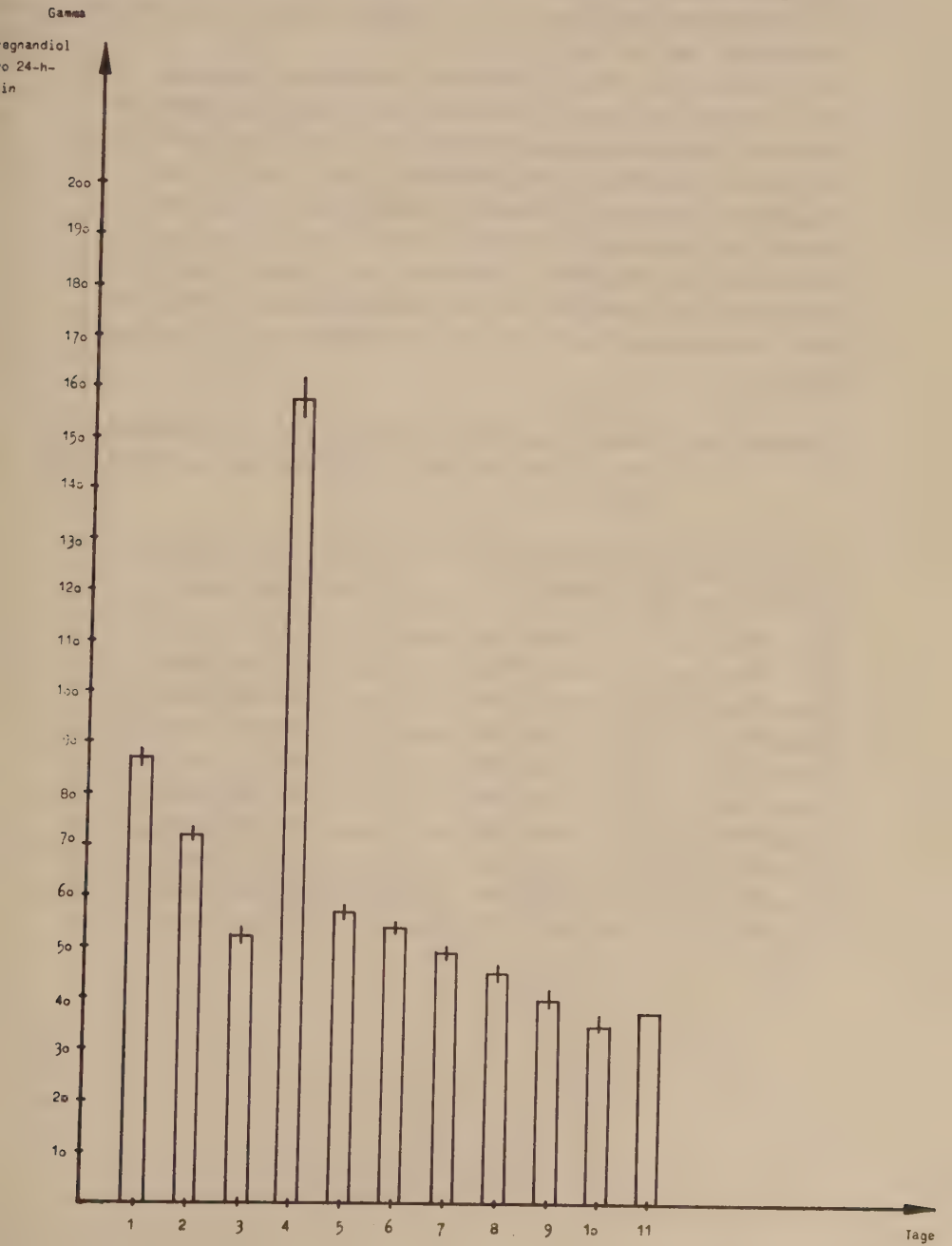
Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag:

Bei 7 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen wird der täglich entnommene 24-h-Urin nach Waldi auf die enthaltene Pregnandiolmenge untersucht. Am 3. Tag post coitum werden 2o I.E. Prolactin "Schering" tief i.m. in den M.glutaeus maximus injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 3 und Abbildung 3. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt ein Pregnandiolanstieg bis auf 158,34±7,7o Gamma. Dieser Spiegel fällt bis zum 7. Tag post injectionem auf einen Pegel von 35,52±1,89 Gamma ab.

Tabelle 3: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
6	1. Tag	87,1o± 2,12
7	2. Tag	72,52± 2,14
7	3. Tag	51,89± 3,67
7	4. Tag	158,34± 7,7o
6	5. Tag	56,73± 3,o8
7	6. Tag	54,o3± 2,2o
7	7. Tag	48,76± 1,37
7	8. Tag	45,o6± 2,72
7	9. Tag	4o,42± 2,82
6	1o. Tag	35,53± 1,89
1	11. Tag	38,2o

Abbildung 3: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag



Versuchsgruppe 4

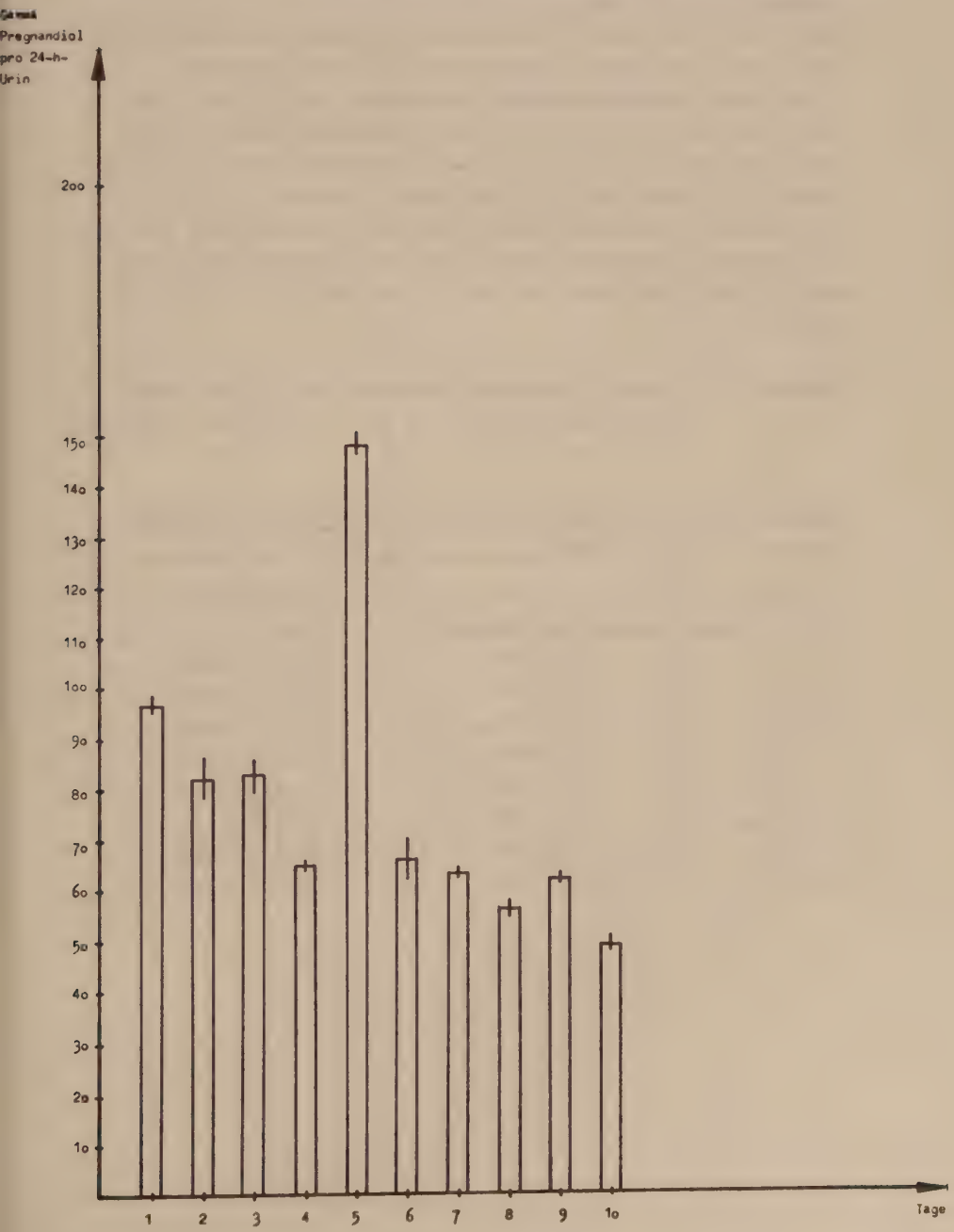
a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 4. Tag:

Bei 2 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen wird der täglich entnommene 24-h-Urin nach Waldi auf die enthaltene Pregnandiolmenge untersucht. Am 4. Tag post coitum werden 2o I.E. Prolactin "Schering" tief i.m. in den M.glutaeus maximus injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 4a und Abbildung 4a. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt ein Pregnandiolanstieg auf $148{,}25 \pm 4{,}74$ Gamma. Am 6. Tag post injectionem sinkt dieser Wert wieder auf $48{,}53 \pm 1{,}59$ Gamma ab.

Tabelle 4a: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 4. Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
2	1. Tag	$97{,}2o \pm 2{,}8o$
2	2. Tag	$72{,}41 \pm 7{,}6o$
2	3. Tag	$73{,}o6 \pm 7{,}oo$
2	4. Tag	$64{,}52 \pm 1{,}53$
2	5. Tag	$148{,}25 \pm 4{,}75$
2	6. Tag	$65{,}93 \pm 7{,}11$
2	7. Tag	$63{,}23 \pm 1{,}56$
2	8. Tag	$55{,}56 \pm 1{,}58$
2	9. Tag	$51{,}57 \pm 1{,}51$
2	1o. Tag	$48{,}53 \pm 1{,}59$

Abbildung 4a: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 4. Tag



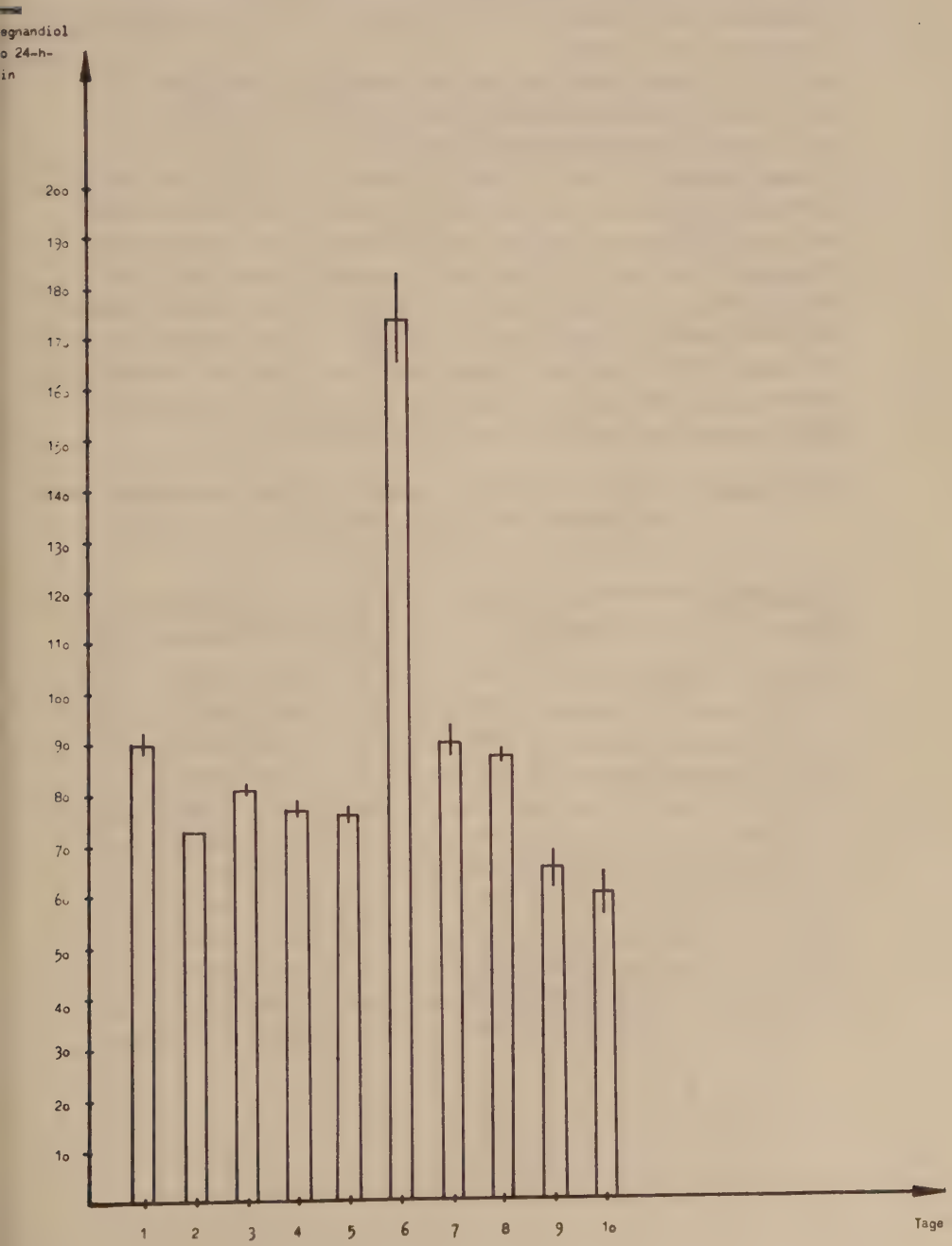
b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 5. Tag:

Bei 2 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen wird der täglich entnommene 24-h-Urin nach Waldi auf die enthaltene Pregnandiolmenge untersucht. Am 5. Tag post coitum werden 2o I.E. Prolactin "Schering" tief i.m. in den M.glutaeus maximus injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 4b und Abbildung 4b. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt ein Pregnandiolanstieg auf 173,52±17,95 Gamma. Am 5. Tag post injectionem sinkt dieser Wert wieder auf 59,35±9,oo Gamma ab.

Tabelle 4b: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 5. Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
2	1. Tag	9o,35± 4,o5
1	2. Tag	78,13
2	3. Tag	81,65± 1,36
2	4. Tag	76,73± 3,o7
2	5. Tag	75,93± 3,oo
2	6. Tag	173,52±17,95
2	7. Tag	89,65± 5,65
2	8. Tag	87,13± 1,6o
2	9. Tag	64,63± 5,4o
2	1o. Tag	59,35± 9,oo

Abbildung 4b: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 5. Tag



Versuchsgruppe 5

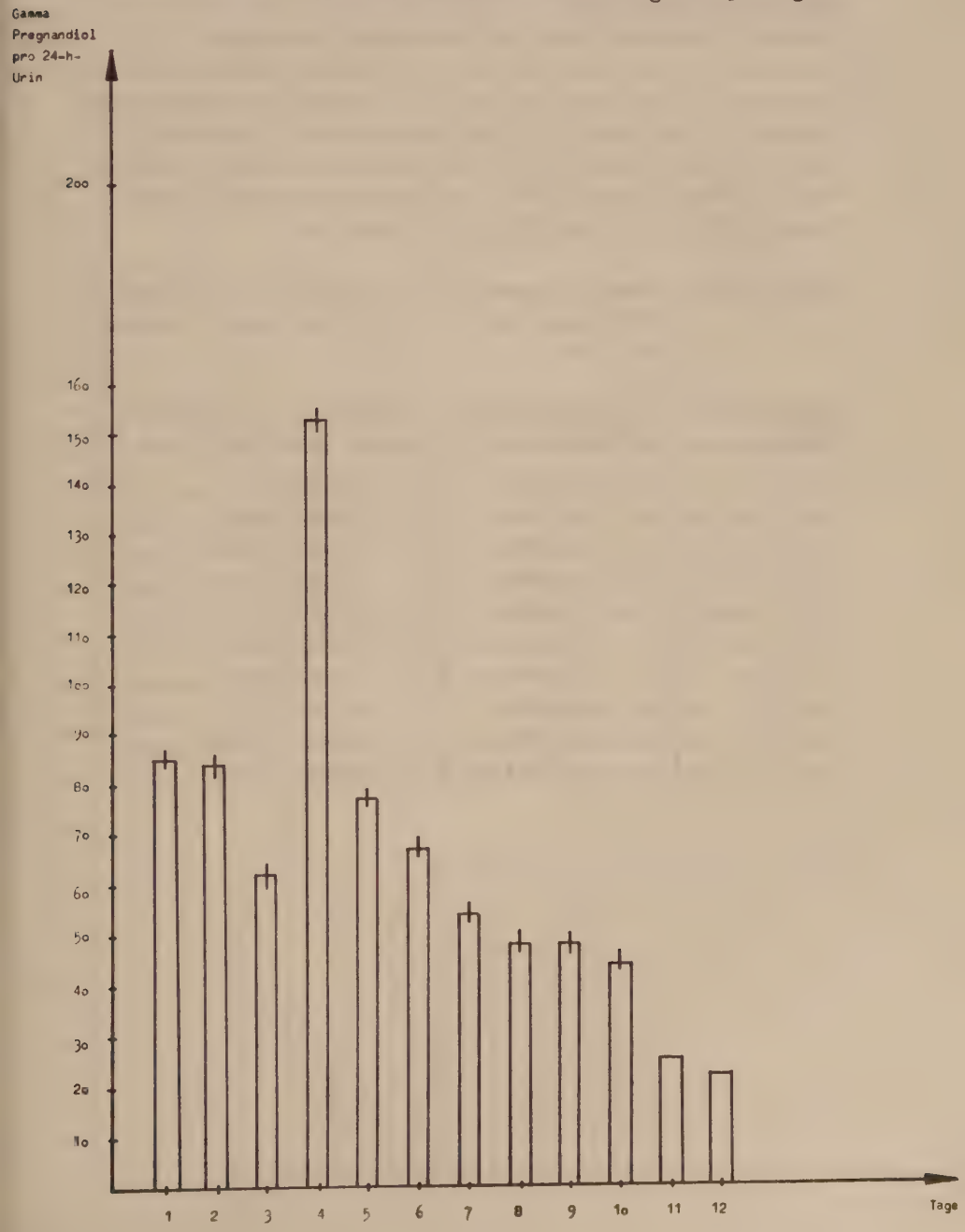
a. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 1o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag:

Bei 8 mit einem sterilen Rammler gedeckten Kaninchen wird der täglich entnommene 24-h-Urin nach Waldi auf die enthaltene Pregnandiolmenge untersucht. Am 3. Tag post coitum werden 1o I.E. Prolactin "Schering" tief i.m. in den M.glutaeus maximus injiziert. Diese Untersuchung dient zur Feststellung der minimalen Wirkdosis und der Dosisabhängigkeit der ausgeschiedenen Pregnandiolmenge von der injizierten Prolactinmenge. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 5a und Abbildung 5a. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt ein Pregnandiolanstieg auf 153,6o±4,o9 Gamma. Am 9. Tag post injectionem sinkt dieser Wert wieder auf 22,oo Gamma ab.

Tabelle 5a: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 1o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
7	1. Tag	84,27± 3,49
8	2. Tag	79,19± 3,73
8	3. Tag	62,8o± 4,56
8	4. Tag	153,6o± 4,o9
8	5. Tag	77,38± 3,45
8	6. Tag	67,65± 4,42
8	7. Tag	53,76± 4,37
8	8. Tag	48,31± 4,68
8	9. Tag	48,11± 4,79
7	1o. Tag	44,14± 4,42
1	11. Tag	25,3o
1	12. Tag	22,oo

Abbildung 5a: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 1o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

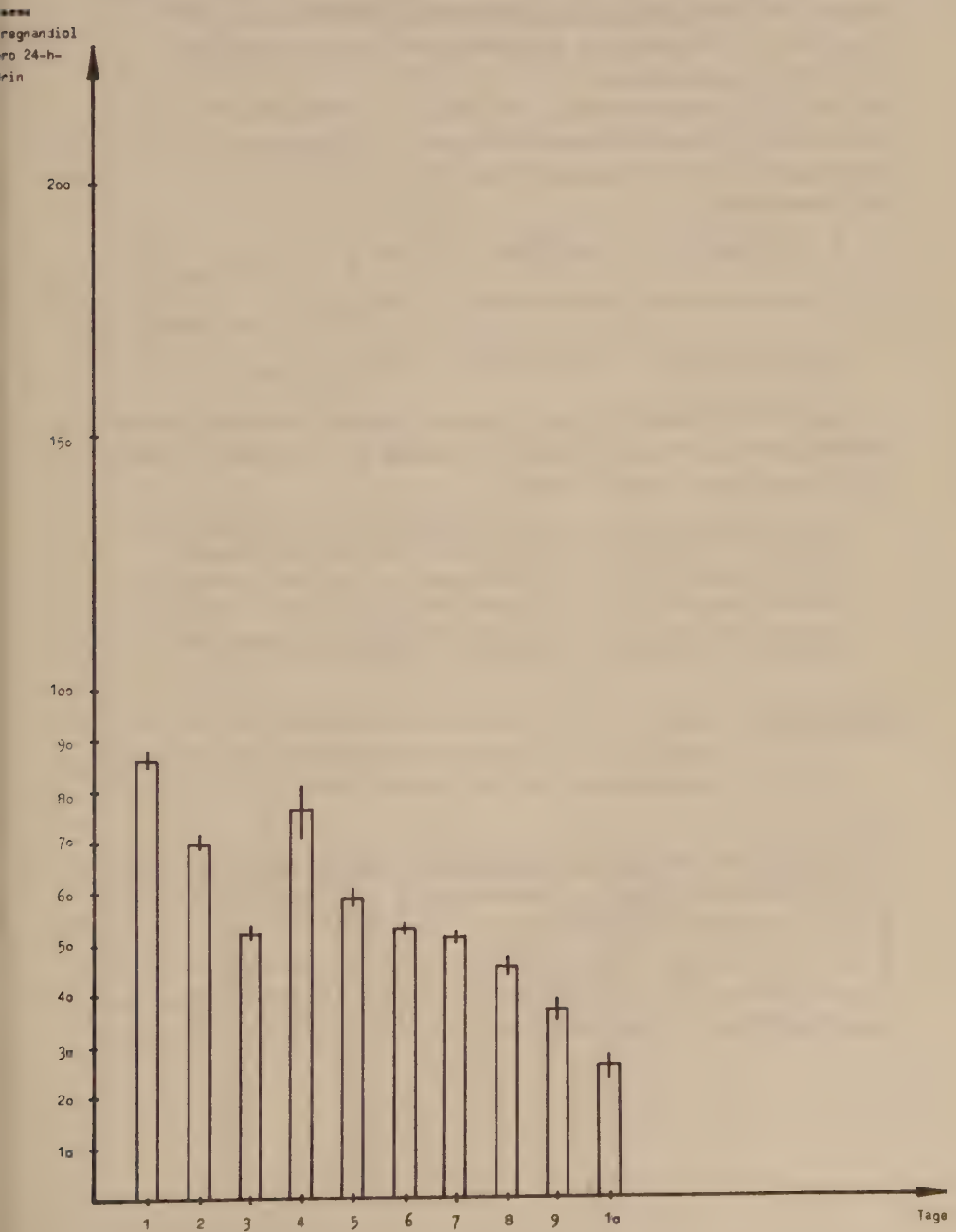


b. Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 5 I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag:
Analog zu Versuchsgruppe 5a werden hier ebenfalls 8 pseudograviden Kaninchen 5 I.E. Prolactin "Schering" injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 5b und Abbildung 5b. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt ein Pregnandiolanstieg auf 76,38±9,51 Gamma. Am 7. Tag post injectionem sinkt dieser Wert wieder auf 26,41±4,48 Gamma ab.

Tabelle 5b: Gamma Pregnandiol pseudogravider Kaninchen nach Injektion von 5 I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag

Anzahl der Tiere	Tag nach dem Decken	Gamma Pregnandiol pro 24-h-Urin
8	1. Tag	85,64± 2,74
8	2. Tag	7o,41± 2,99
7	3. Tag	51,71± 2,24
8	4. Tag	76,38± 9,51
8	5. Tag	58,75± 1,43
8	6. Tag	53,o7± 1,37
8	7. Tag	51,25± 1,23
6	8. Tag	45,oo± 2,71
7	9. Tag	37,29± 4,14
8	1o. Tag	26,41± 4,58

Abbildung 5b: Pseudogravide Kaninchen nach Injektion von 5 I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag



Versuchsgruppe 6

Zunahme der Pregnandiolausscheidung im ersten 24-h-Urin nach Prolactininjektion gegenüber der Ausscheidung vor der Prolactininjektion:

Es soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die ausgeschiedene Pregnandiolmenge in Relation zur injizierten Prolactinmenge steht.

Es werden bei

8 pseudograviden Kaninchen am 3. Tag p.c.
5 I.E. Prolactin

8 pseudograviden Kaninchen am 3. Tag p.c.
1o I.E. Prolactin

7 pseudograviden Kaninchen am 3. Tag p.c.
2o I.E. Prolactin

injiziert. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte finden sich in Tabelle 6 und Abbildung 6. Im ersten 24-h-Urin post injectionem erfolgt

nach Injektion von 5 I.E. Prolactin ein Pregnandiolanstieg von $51,71 \pm 2,24$ Gamma auf $76,38 \pm 9,51$ Gamma

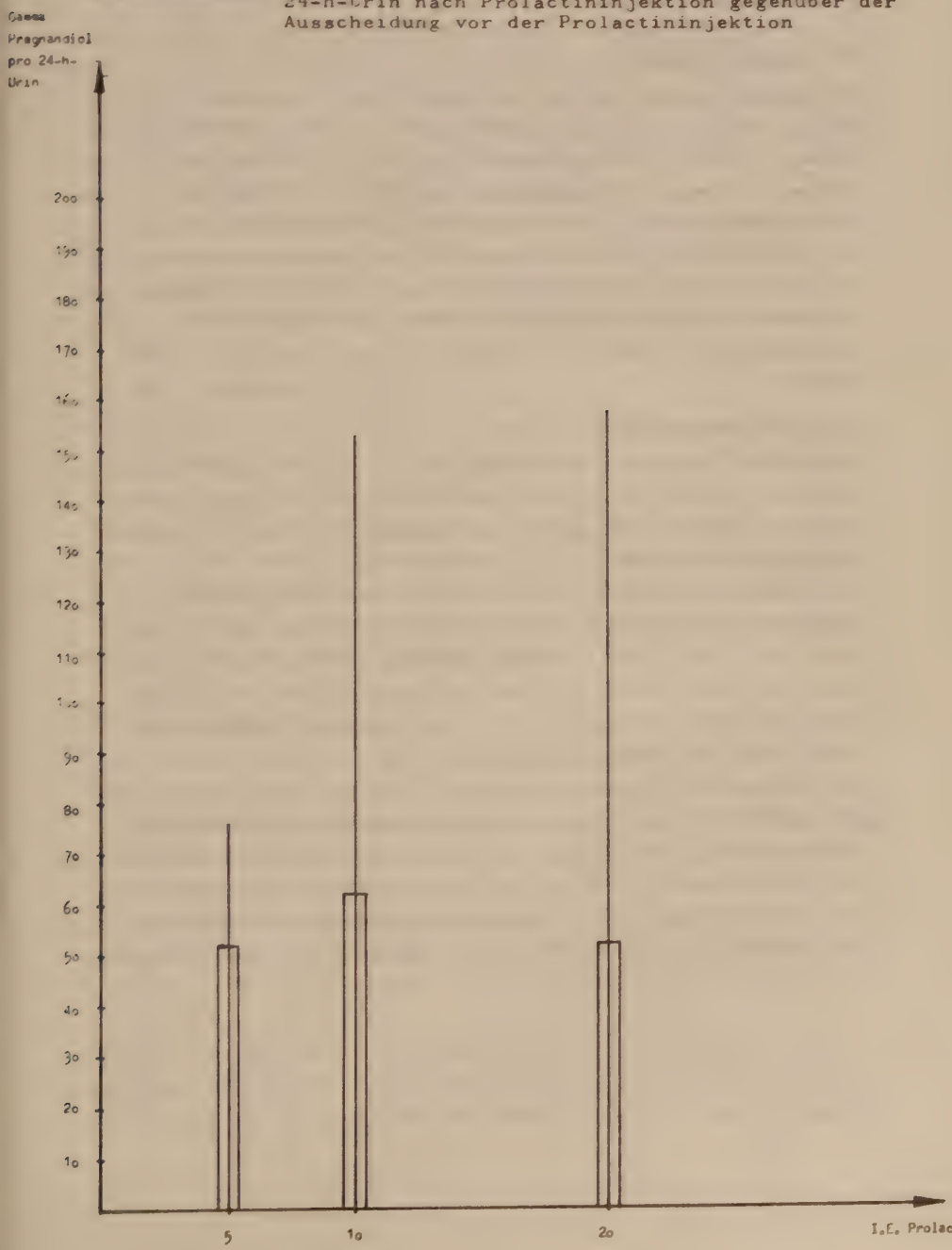
nach Injektion von 1o I.E. Prolactin ein Pregnandiolanstieg von $62,8o \pm 4,56$ Gamma auf $153,6o \pm 4,o9$ Gamma

nach Injektion von 2o I.E. Prolactin ein Pregnandiolanstieg von $51,89 \pm 3,67$ Gamma auf $158,34 \pm 7,7o$ Gamma.

Tabelle 6: Zunahme der Pregnandiolausscheidung im ersten 24-h-Urin nach Prolactininjektion gegenüber der Ausscheidung vor der Prolactininjektion

injizierte Prolactinmenge	Pregnandiolausscheidung vor Prolactininjektion	Pregnandiolausscheidung nach Prolactininjektion
5 I.E.	$51,71 \pm 2,24$	$76,38 \pm 9,51$
1o I.E.	$62,8o \pm 4,56$	$153,6o \pm 4,o9$
2o I.E.	$51,89 \pm 3,67$	$158,34 \pm 7,7o$

Abbildung 6: Zunahme der Pregnandiolausscheidung im ersten 24-h-Urin nach Prolactininjektion gegenüber der Ausscheidung vor der Prolactininjektion



Diskussion

Ad Versuchsgruppe 1

Das Kaninchen kann durch den Deckakt mit einem sterilen Rammler zum Follikelsprung provoziert werden. Aus dem rupturierten Follikel entsteht ein Corpus luteum. Im Corpus luteum wird Progesteron gebildet. Es kann durch seinen Metaboliten, das Pregnandiol, nachgewiesen werden. Die Analysenwerte zeigen, daß die Pregnandiolmenge pro 24-h-Urin von einem Maximum von $91,87 \pm 17,48$ Gamma am ersten Tag post coitum schon am 3. Tag auf einen sich annähernd konstant haltenden Spiegel von 20-35 Gamma absinkt.

Ad Versuchsgruppe 2

Mit 20 I.E. Prolactin "Ferring", die am 3. Tag post coitum injiziert werden, soll versucht werden, das Corpus luteum zu einer erhöhten Progesteronproduktion und somit Pregnandiolausscheidung im Urin zu stimulieren.
Von einem Maximalwert von $90,35 \pm 2,15$ Gamma Pregnandiol am ersten Tag post coitum erfolgt ein Abfall auf $30,13 \pm 5,18$ Gamma am 4. Tag. Ein erneuter Anstieg ist bis zum 7. Tag nicht zu verzeichnen. Das injizierte Prolactin "Ferring" bleibt völlig wirkungslos. Die Analysenwerte entsprechen etwa denen der Versuchsgruppe 1.
Das injizierte Prolactin "Ferring", das als Handelspräparat in Pulverform vorliegt, ist im beigegebenen Lösungsmittel (s.Reagentien) nur unvollständig löslich. Die Mischung bleibt auch nach Stunden trüb und enthält sichtbare Partikel.
Es wird vermutet, daß die mangelnde Löslichkeit in vitro die Ursache für die mangelnde biologische Aktivität in vivo ist.

Ad Versuchsgruppe 3

Nach Injektion von 20 I.E. Prolactin "Schering" i.m. am 3. Tag erfolgt im ersten 24-h-Urin post injectionem ein Pregnandiolanstieg bis auf 158,34±7,70 Gamma. Dieser Spiegel fällt bis zum 7. Tag post injectionem wieder auf den Normalwert von 35,52±1,89 Gamma ab.
Das Prolactin "Schering" ist im Gegensatz zum Prolactin "Ferring" spontan physiologischer Kochsalzlösung löslich. Dieser Versuch zeigt deutlich, daß sich die Progesteronausschüttung am Corpus luteum eines pseudograviden Kaninchens durch Prolactininjektion stimulieren läßt.

Ad Versuchsgruppe 4a und 4b

Nach Injektion von 20 I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag post coitum erfolgt ein Pregnandiolanstieg auf 158,34±7,70 Gamma, am 4. Tag auf 148,25±4,75 Gamma, am 5. Tag auf 173,52 ±17,95 Gamma. Zwischen den Prolactininjektionen am 3., 4. oder 5. Tag post coitum besteht in der Pregnandiolausscheidung keine signifikanter Unterschied. In diesem Zeitraum ist das Corpus luteum durch Prolactin etwa gleich stark zur Progesteronausschüttung stimulierbar.

Ad Versuchsgruppe 5

Durch diese Versuchsgruppe soll die minimal wirksame Prolactindosis, die bei dieser Versuchsanordnung zu einer nachweisbar erhöhten Pregnandiolausscheidung führt, und die Dosisabhängigkeit von injizierter Prolactinmenge zur Pregnandiolausscheidung geprüft werden.
Bezugswert dieser Untersuchung ist die Zunahme der Pregnandiolausscheidung am 4. Tag post coitum nach einer Prolactingabe am 3. Tag post coitum gegenüber dem Wert vor der Prolactingabe.
Während bei der Injektion von 10 I.E. Prolactin am 3. Tag noch ein deutlicher Pregnandiolanstieg von 153,60±4,09 Gamma zu ersehen ist, bleibt der Pregnandiolanstieg nach Injektion

von 5 I.E. Prolactin am 3. Tag mit einer Pregnandiolausscheidung von $76,38 \pm 9,51$ Gamma im Bereich des Spiegels, der bei nur pseudograviden Tieren ohne Injektion festgestellt wird.
Bei 5 I.E. Prolactin handelt es sich bei dieser Versuchsanordnung um die Minimaldosis von Prolactin, nach der überhaupt noch ein Pregnandiolanstieg nachgewiesen werden kann.

Beantwortung der Fragestellung:

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß durch diese Versuchsanordnung Prolactin nachgewiesen werden kann:

Ein durch einen sterilen Deckakt aus einem rupturierten Follikel gebildetes Corpus luteum läßt sich durch i.m. injizierte Prolactingaben zu einer erhöhten Progesteronausscheidung, gemessen am Anstieg des Harnpregnandiols, stimulieren.
Das Alter des Corpus luteum ist im Zeitraum von 3 - 5 Tagen post coitum für das Ausmaß der Corpus-luteum-Stimulierung nicht entscheidend: Ob das Prolactin am 3., 4. oder 5. Tag injiziert wird, zeigt sich kein signifikanter Unterschied oder gar eine Relation zwischen dem Alter des Corpus luteum und der ausgeschiedenen Pregnandiolmenge. Zwischen der injizierten Prolactinmenge und der Pregnandiolausscheidung besteht keine klare Relation. Eine eindeutige Dosis Wirkungsabhängigkeit kann nicht bewiesen werden. Die Pregnandiolausscheidung ist nach Injektion von 20 I.E. Prolactin annähernd genauso hoch wie nach Injektion von 10 I.E. Prolactin. Die Methode kann also nicht als quantitativer, sondern nur als qualitativer Nachweis dienen. Die Minimaldosis einer Prolactininjektion, unterhalb der kein deutlicher Progesteronanstieg mehr zu erreichen ist, liegt ungefähr bei 5 I.E. Auch ein qualitativer Prolactinnachweis ist nur möglich, wenn die zu untersuchende Prolactinmenge mindestens mehr als 5 I.E. beträgt.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob die luteotrope Aktivität von Prolactin das Corpus luteum eines durch einen sterilen Rammler gedeckten Kaninchens so zur Produktion von Progesteron stimuliert, daß die ausgeschiedene Pregnandiolmenge als Maß für die injizierte Prolactinmenge angesehen werden kann. Das ausgeschiedene Pregnandiol wurde durch Dünnschichtchromatographie nach Waldi bestimmt.

Als Voruntersuchung wurden als Leerwert die Pregnandiolwerte beim pseudograviden Kaninchen bestimmt: Die Pregnandiolmenge pro 24-h-Urin sank von einem Maximum von $91,87 \pm 17,48$ Gamma am ersten Tag post coitum auf einen Spiegel von 2o - 35 Gamma ab dem 3. Tag ab.

Nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Ferring" am 3. Tag entsprachen die Werte mit einem Maximalwert von $9o,35 \pm 2,15$ Gamma Pregnandiol am ersten Tag post coitum und einem Abfall auf $33,13 \pm 5,18$ Gamma am 4. Tag post coitum annähernd den Werten des Leerwerts, was wahrscheinlich durch die schlechte in vitro Löslichkeit des in Pulverform vorliegenden Handelspräparates begründet sein dürfte.

Nach Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag erfolgte ein deutlicher Anstieg der ausgeschiedenen Pregnandiolmenge mit einem Maximum schon am 1. Tag post injectionen bis auf $158,34 \pm 7,7o$ Gamma. Dieser Spiegel fiel bis zum 7. Tag post injectionen auf $35,52 \pm 1,89$ Gamma ab.

Der Zeitpunkt der Prolactininjektion post coitum zeigte auf die ausgeschiedene Pregnandiolmenge keine signifikante Wirkung. Während die Injektion von 2o I.E. Prolactin "Schering" am 3. Tag post coitum mit einem Pregnandiolanstieg auf $158,34 \pm 7,7o$ Gamma beantwortet wurde, ergab die Injektion derselben Menge Prolactin am 4. Tag post coitum einen Anstieg auf $148,25 \pm 4,74$ Gamma, die Injektion am 5. Tag post coitum einen Anstieg auf $173,52 \pm 17,95$ Gamma.

Eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit zwischen injizierter Prolactinmenge und Pregnandiolausscheidung konnte nicht gefunden werden. Die Injektion von 2o I.E. am 3. Tag post coitum erbrachte eine Pregnandiolausscheidung von 158,34±7,7o Gamma, die Injektion von 1o I.E. eine Ausscheidung von 153,6o±4,o9 Gamma. Die Injektion von 5 I.E. Prolactin ergab lediglich eine Pregnandiolausscheidung von 76,38±9,51 Gamma, ein Wert, der im Bereich des Spiegels lag, der bei pseudograviden Tieren ohne Injektion festgestellt wurde. Es dürfte sich bei Injektion von 5 I.E. um die minimale Wirkdosis handeln, die mit dieser Methode erfaßt werden konnte.

Prolactin ließ sich durch diese Versuchsordnung qualitativ, nicht aber quantitativ im Sinne einer Dosis-Wirkungsabhängigkeit nachweisen. Der qualitative Nachweis war jedoch nur möglich, wenn die zu untersuchende Prolactinmenge über 5 I.E. lag.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Ammon R. und Dirschel W.
   Fermente, Hormone, Vitamine
   Band II (1960) 578-600.

2. Bergman A.J., Turner C.W. und Meites J.
   Endocrinol. 26 (1940) 716.

3. v. Berswordt-Wallrabe R.
   Luteotrophic hormone complexes. A tentativ theory.
   Proceedings XXII. International Congress of the int.
   Unions of Physiological sciences. 742-745
   Leiden 1962.

4. Bradley Z.R. und Clarke P.M.
   The response of rabbit mammary glands to locally
   administration of prolactin.
   J. Endocr. 14 (1956) 46-49.

5. Browning H.C., Larke G.A. und White W.D.
   Bioassay of LH and LTH activity by a direct method.
   Preliminary report.
   J. Ark. Med. Soc. 60/2 (1963) 46.

6. Desaive P.
   Essais d'interpretation endocrinienne des ruptures
   folliculaires chez la lapine adulte
   Ann. d'Endocrin. 14 (1953) 563-571.

7. Fotherby K.
   The biochemistry of progesteron.
   Vitam. and Horm. 22 (1964) 153-204.

8. Frisch F.
   Pregnandiolausscheidung des Kaninchens (1967).

9. Hammond jr. J.
   The rabbit corpus luteum: oestrogen prolongation
   and the accompanying changes in the genitata.
   Acta endocrin. (Copenh.) 21 (1956) 307-320.

10. Hammond and Marshall
    Correlation between ovaric, uterus and mammary gland
    in Rabbit.
    Proc.roy.Soc., Lond.87 (1911).

11. Knaus H.
    Die Physiologie der Zeugung des Menschen.
    3. Aufl. (1950) 57.

12. Leblond C.P. und Allen E.
Méthode rapide de recherche de la prolactine. (hormone lactogène de l'hypophyse).
C.R.Soc. Biol. Paris 124 (1937) 119o.

13. Lyons W.R.
The direct mammotropic action of lactogenic hormone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51 (1942) 3o8.

14. Lyons W.R. und Page E.
Detection of mammotropin in the urine of lactating women.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 32 (1935) 1o49.

15. Meites J., Bergman A.J. und Turner C.W.
Endocrinolog. 28 (1941) 7o7.

16. Rapport S.M.
Medizinische Biochemie (1969) 775.

17. Rabald E. und Voss H.E.C.
Über das Vorkommen und die Eigenschaften des Laktationshormons.
Hoppe - Seylers Zschr. physiol. chem. 71 (1932) 261.

18. Rauen H.M.
Biochemisches Taschenbuch (1964) 667.

19. Reece R.P. und Turner C.W.
Res.Bull.Mo.agric.exp.Stat.266 (1937).

2o. Riddle O., Bates R.W. und Dykshorn S.W.
Amer.J.Physiol. 1o5 (1933) 191.

21. Riddle O. und Braucher P.F.
Studies on the physiology of reproduction of birds.
Amer.J.Physiol. 97 (1931).

22. Scowen E.F. und Hadfield G.
Mammotropic activities of extracte of human urine.
A preliminary report.
Cancer 8 (1955) 89o.

23. Seitz L. und Amreich A.J.
Biologie und Pathologie des Weibes
Band I (1953) 75-79.

24. Waldi D. und Munter F.
Ein Frühschwangerschaftsnachweis mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.
Med. Exp. (Basel) 3 (196o) 45-52

25. Waldi D.
Eine quantitative Schnellbestimmung von Pregnandiol auf Dünnschichtplatten zum Schwangerschaftsnachweis und zur Überwachung des Zyclus der Frau.
Klin.Wschr.4o (1962) 827-83o.

26. Waldi D.
Dünnschicht-Chromatographie im ärztlichen Labor.
Das ärztl. Labor 9 (1963) 221-227.

27. Westphal U.
Über die Umwandlung des Progesterons in Pregnandiol beim Kaninchen.
Hoppe-Seylers Z.273 (1942) 1-12.

28. Wolthuis O.L.
A new prolactin assay method. Some experiments which provide arguments for its specifity.
Acta endocr. (Kbh.) 42 (1963) b, 38o.

Lebenslauf

Ich, Eberhard Brosi, wurde am 26. Januar 1943 in Stuttgart als Sohn des Studienrates Helmut Brosi und seiner Ehefrau Margarete Brosi geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bietigheim und des Bietigheimer Gymnasiums bestand ich im Frühjahr 1962 das Abitur. Das Studium der Medizin begann ich im Sommersemester 1962 an der Universität Tübingen, wo ich im Juli 1963 die naturwissenschaftliche und im Februar 1966 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach einem Auslandssemester an der Universität Wien setzte ich mein klinisches Studium in Tübingen fort. Im Frühjahr 1967 begann ich an der Universitätsfrauenklinik meine Dissertation. Am 6.8.1969 legte ich das medizinische Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich mit 8 Monaten Chirurgie, 4 Monaten Gynäkologie und 4 Monaten Innere Medizin am Städt. Krankenhaus in Bietigheim ab. Zur Zeit bin ich als Assistent bei einem praktischen Arzt in Stuttgart tätig.